

**Arterio-venöse Differenz
der Aminosäuren**

Johann Friedrich Meyer



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus der II. Med.Klinik der Universität München

Direktor: Professor Dr.Dr. G. BODECHTEL

ARTERIO - VENÖSE DIFFERENZ

DER

AMINOSÄUREN

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin

verfaßt vor einer Hohen Medizinischen Fakultät der

Ludwig - Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Johann Friedrich Meyer

aus

Oettingen/Bayern

München 1957



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Referent: Privat-Dozent Dr. A. BERNSMEIER

Coreferent: Professor Dr. Dr. G. BODECHTEL

Dekan: Professor Dr. W. BÜNGELER

Tag der mündlichen Prüfung: 3. 9. 57

Inhaltsverzeichnis

EINLEITUNG

I. Methode

Zusammenfassung der schließlich
erarbeiteten Methode

- 1.) Blutentnahme
- 2.) Aufarbeitung des Blutes für die
papierchromatographische Unter-
suchung,
- 3.) Papierchromatographie
 - a) Auftragen
 - b) Chromatographievorgang
 - c) Entwickeln
 - d) Identifizierung
 - e) Ausmessen
- 4.) Fehlerquellen und Fehlerbreite
der Methode

II. Erwägungen und experimentelle Unter- suchungen

- 1.) Enteiweißung
- 2.) Aufbringen des Blutfiltrates auf
das Chromatogrammpapier
 - a) Auftragen
 - b) Aufzutragende Mengen
- 3.) Lösungsmittel und deren Verände-
rung bei Zusatz von Ionen
- 4.) Entwickeln
- 5.) Quantitative Auswertung der
Chromatogramme
- 6.) Stehlaßeffekt

III. Ergebnisse

IV. Diskussion

Einleitung

Für die normale Hirnfunktion sind die Glukose und der Sauerstoff unbedingt notwendig. Hypoglykämie und Anoxie des Gehirns führen zur Bewußtlosigkeit und bei längerer Dauer zum Tod. Es ist aber auch schon seit langem bekannt, daß die Aminosäuren im Hirnstoffwechsel eine nicht unbedeutende Rolle spielen. Zwischen Gehirnschubstanz und Blut besteht ein großes Aminosäuren - Konzentrationsgefälle, bei der Ratte 6:1, beim Menschen 8:1. In den verschiedenen Hirnregionen ist dieses Verhältnis verschieden (AWAPARA (1)). Valinmangelratten sind abnorm im Benehmen und Stellung und zeigen degenerative Veränderungen im Rückenmark (FERRARO u. ROIZIN (3)). In letzter Zeit erschienen sehr viele Arbeiten über die Glutaminsäure im Zusammenhang mit dem Gehirnstoffwechsel. Obwohl man bereits weiß, daß zumindest gewissen Aminosäuren eine Bedeutung für den Hirnstoffwechsel zukommt, ist das Problem des Aminosäurenstoffwechsels noch nicht vollständig gelöst. Es erschien daher angezeigt, das Aminosäuren-Problem im Rahmen klinischer Untersuchungen aufzugreifen und zu bearbeiten.

Den Untersuchungen auf diesem Gebiet waren bis vor kurzem enge methodische Grenzen gesetzt. Die Trennung der einzelnen Amino-Säuren war sehr kompliziert und zeitraubend, die Gesamt-Aminosäurebestimmungen sind für unsere Untersuchungen ungeeignet. Auch die Fehlerbreite der quantitativen Aminosäurebestimmungsmethoden ist teilweise ziemlich groß (HINSBERG - LANG (10)). Was die Spezifität und die Genauigkeit anbelangt, wären biologische Methoden geeignet. Sie erfordern jedoch einen großen technischen Aufwand und scheiden damit für die vorliegende Arbeit aus.

Neuerdings bietet die Papierchromatographie vielversprechende Möglichkeiten, die Aminosäuren relativ einfach zu trennen und anschließend sogar quantitativ zu erfassen (TURBA (17), Cramer (2)). Es wurde daher mit Hilfe dieses Verfahrens versucht, eine Methode auszuarbeiten, die mit geringem Aufwand einen Überblick über die freien Amino-Säuren des Blutes gibt.

Es sollte insbesondere der Gehalt an freien Aminosäuren des arteriellen Blutes und des venösen der Vena jugularis verglichen werden, um aus den arterio-venösen Differenzen eventuell einen Einblick in den Gehirnstoffwechsel der Aminosäuren zu erhalten. Zur Präzisierung des Einblickes diene die gleichzeitige Messung der cerebralen Zirkulation nach der modifizierten Methode von KETHY und SCHMIDT, sowie die Bestimmung des Sauerstoff- und Glukose-Stoffwechsels.

I. Methode

Auf Grund der zunächst vorgenommenen Untersuchungen zur Verbesserung und Präzisierung einer einfachen papierchromatographischen Bestimmungsmethode von Aminosäuren im Blut kamen wir schließlich zu folgendem Verfahren:

1. Blutentnahme

Durch Punktion des Bulbus venae jugularis und der Arteria femoralis wird venöses und arterielles Blut gewonnen. Das Nativblut wird mit einer vorher mit heparinhaltiger Kochsalzlösung durchgespülten Glasspritze abgenommen (20 cm^3 physiologische Kochsalzlösung + $0,5 \text{ cm}^3$ Heparin). Die heparinhaltige Kochsalzlösung wird aufgezogen und dann wider vollständig ausgespritzt, so daß nur die Wände der Glasspritze benetzt sind. Man nimmt jeweils 6 cm^3 Blut ab und gibt es sofort nach der Abnahme in durch Eiswasser gekühlte Zentrifugengläser.

2. Aufarbeitung des Blutes für die papierchromatographische Untersuchung

Dieser ganze Arbeitsabschnitt wird bei etwa 0° Celsius im Kühlraum durchgeführt. Das Blut wird 10 Minuten lang bei einer Umdrehungszahl von 3000/Min. zentrifugiert. Die Blutkörperchen sedimentieren, das Plasma steht über. Man gibt dann jeweils 1 cm^3 Plasma in 4 cm^3 Äthanol (96%) und rührt anschließend mit einem Glasstab gut um. Darauf zentrifugiert man erneut das Plasma-Alkoholgemisch 10 Minuten lang bei einer Umdrehungszahl von 3000/Min. Die denaturierten Proteine setzen sich dabei fest ab. Das Überstehende enthält neben Äthanol alle nicht mit Alkohol fällbaren Substanzen, darunter auch die Aminosäuren. Das Überstehende wird abgegossen und sofort auf das Chromatogrammpapier aufgetragen und zwar, wie im folgenden beschrieben.

3. Papierchromatographie

a.) Auftragen

Man markiert mit dem Bleistift auf dem Chromatographiepapier (Schleicher & Schüll 4043b, $29 \frac{1}{2} \text{ cm}$ mal 30), 3 cm vom Rand der schmaleren Seite entfernt, eine Startlinie, und darauf die einzelnen Startpunkte je 3 cm voneinander entfernt. Zur Kenntlichmachung der Faserrichtung des Papiers werden die Bogen mit einer längeren und einer kürzeren Seite geliefert. Die Faserrichtung hat nämlich einen Einfluß auf die R_f - Werte. Die seitliche Entfernung der einzelnen Startpunkte vom Papierrand muß mindestens $5 - 6 \text{ cm}$ betragen, da sonst der Chromatographievorgang durch kapilläre Kräfte gestört wird.

Mit einer auf 0° Celsius abgekühlten Blutzuckerpipette trägt man 100 mm^3 des ebenfalls abgekühlten Blutfiltrates Tropfen um Tropfen auf und zwar aus technischen Gründen bei Zimmertemperatur. Zwei Chromatogramme,

die miteinander verglichen werden sollen, werden immer mit derselben Pipette aufgetragen. Daran anschließend wird die Pipette jedesmal ausgewaschen, getrocknet und wieder auf 0° Celsius abgekühlt, um immer dieselbe Ausgangslage zu schaffen.

Beim Auftragen ist genauestens darauf zu achten, daß die Startpunkte gleichmäßig sind und nie einen größeren Durchmesser als 1 cm haben. Durch einen kalten Luftstrom wird das Eintrocknen der Tropfen beschleunigt. Das Chromatographiepapier wird dabei durch den kalten Luftstrom von oben gegen die Unterlage gedrückt und braucht nicht eigens befestigt zu werden. Die Startpunkte werden so gelagert, daß sie beim Auftragen nicht mit der Unterlage in Berührung kommen. Daher bringt man senkrecht unter dem Fön eine kreisrunde Öffnung von 3,5 cm Durchmesser in der Unterlage an.

b.) Chromatographievorgang.

Nach dem Aufbringen des Blutfiltrates werden die Papiere zu Zylindern zusammengeknüpft. Es werden nur oben und unten an dem übereinanderliegenden Papier Nähte angebracht, die das Papier zusammenhalten. Zwischen diesen Nähten werden Papierstreifen so herausgeschnitten, daß sich die freien Ränder nicht berühren. Diese Zylinder stellt man nun 17 Stunden lang in Petrischalen, die mit Lösungsmittel gefüllt sind und zwar mit:

n-Butanol : Eisessig : Aqua dest. = 4 : 1 : 1.

Nach abgeschlossenem Chromatographieprozeß werden die Chromatographiepapiere luftgetrocknet und entwickelt.

c.) Entwickeln

Um die Aminosäureflecke sichtbar zu machen, werden die trocknen Chromatogramme in die Entwicklungsflüssigkeit

100 mg	Ninhydrin	
30 cm ³	Aceton	
45 cm ³	Isopropylalkohol	
5 cm ³	Aqua dest.	getaucht,

sofort wieder herausgenommen und 5 Minuten lang in einen Trockenschrank von 90° Celsius gehängt. In der Wärme färben sich die Aminosäuren an. Damit sich die Chromatogramme nicht ungleichmäßig färben, dreht man sie von Zeit zu Zeit in Trockenschrank um. Dann läßt man die gefärbten Chromatogramme über Nacht bei Zimmertemperatur liegen und mißt sie am nächsten Tag wie unten beschrieben aus.

d.) Identifizierung der einzelnen Aminosäuren.

Man trägt auf zwei nebeneinanderliegende Startpunkte die gleiche Menge des zu untersuchenden Substanzgemisches auf und gibt dann zusätzlich zu einem der beiden eine bekannte Aminosäure. Beim Vergleichen der beiden dann erhaltenen Chromatogramme fällt die zugesetzte "Test-Aminosäure" deutlich auf. Sie kennzeichnet die Wanderungsstrecke - R_f - Wert (R_f - Wert = von der Substanz zurückgelegten Strecke: von der Lösungsmittelfront zurückgelegten Strecke) - der "Test-Aminosäure" im Milieu des betreffenden Blutfiltrates. Der Aminosäurefleck, der sich an derselben Stelle beim reinen Blutfiltrat befindet, entspricht dann, gute chromatographische Trennung vorausgesetzt, der "Test-Amino-Säure", das heißt, die betreffende

Blutaminosäure ist damit identifiziert. Auf diese Weise kann man alle Blutaminosäuren identifizieren.

e.) Ausmessen der Chromatogramme.

Durch das Vorschaltgerät für Papierchromatographie zum "Eppendorf-Photometer" (Hersteller: Netheler & Hinz, Hamburg-Eppendorf) und mit einer Linse für Nephelometrie ist es möglich, die Chromatogramme ohne Vorbehandlung mit Transparentöl auszumessen. Das Chromatogramm wird dabei wie bei der Elektrophorese zwischen zwei Glasplatten gelegt und an einem 1 mm breiten und 17 mm langen Spalt, der von parallelem Licht durchstrahlt wird, vorbeigeführt. Das durch den Streifen fallende Licht wird von einer Photozelle aufgenommen. Nach jedem Vorwärtsschub von 1 mm wird die Extinktion notiert und als Funktion der Weglänge graphisch dargestellt. Man erhält dabei im Prinzip stets folgende Standardkurve, deren Maxima zwar von Mensch zu Mensch verschieden hoch, aber immer vorhanden sind.

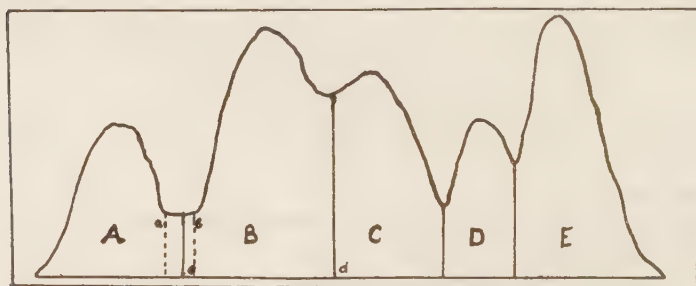


Abb. 1: Standardkurve sowie Skizze zur Erklärung des tiefsten Punktes.

Durch die Berechnung der Fläche der Kurve bekommt man ein Maß für die Aminosäuremengen in den einzelnen Zonen des Chromatogrammes. Die Fläche ist nämlich der Menge proportional. Um die einzelnen Kurvenabschnitte besser beurteilen zu können, teilt man jede Kurve in fünf Abschnitte A, B, C, D und E ein, indem von den tiefsten Punkten der Kurve jeweils das Lot auf die Abszisse gefällt wird. Beim Vergleich von zwei oder mehreren Kurven achtet man außerdem darauf, daß die entsprechenden Grundlinien (z. B. c - d) der zu vergleichenden Kurvenabschnitte immer gleich groß sind. (Siehe auch: Quantitative Auswertung der Chromatogramme!) Nimmt man nämlich an, daß im Extremfall die Strecke a - b eine Gerade wird, so könnte man jeden Punkt der Strecke a - b als den tiefsten annehmen. Dadurch bestünde aber die Möglichkeit, wie aus Abb. 1 ersichtlich ist, eine Fläche enorm zu verkleinern oder zu vergrößern.

4.) Fehlerbreite der Methode

Um die Leistungsfähigkeit und die Schwächen der verwendeten Methode zu beurteilen, wurden folgende Versuche durchgeführt: Eine 10 mg%ige Glutaminsäurelösung wurde mit 96%igem Alkohol (Äthanol) 1:4 verdünnt. Davon wurde auf einem Chromatogrammb Blatt sechs mal die gleiche Menge

aufgetragen ($= 100 \text{ mm}^3 = 2 \text{ Gamma}$), dann lief das Chromatogramm durch die Versuchsanordnung. So entstanden sechs Kurven und nach deren Ausplanimetrieren nachstehende Flächenwerte:

487 ME 492 ME 508 ME 475 ME 510 ME 505 ME

(ME = Meßeinheit = 0,01 Extinktion).

Die Streuung dieser Werte berechneten wir nach Gauß

$$m = \sqrt{\frac{\sum (vv)}{n-1}}$$

m = Fehler (= Streuung)

v = Abweichung vom Mittelwert

$\sum (vv)$ = Summe der Quadrate der Abweichungen vom Mittelwert der Ergebnisse der durchgeführten Versuchsreihe

n = Zahl der durchgeführten Messungen

Auswertung der vorangehend aufgeführten Meßergebnisse

Meßergebnisse	v	(vv)
487	-9	81
492	-4	16
508	+12	144
475	-21	441
510	+14	196
505	+9	81

Mittelwert = 496

$\sum (vv) = 959$

Durch Einsetzen in die Gauß'sche Formel erhält man

$$m = \sqrt{\frac{959}{5}} = 14$$

Daraus folgt:

496 ME entsprechen 2 Gamma = 100%

14 ME entsprechen 0,06 Gamma = 3%

Unsere Methode ist also auf $\pm 0,06$ Gamma genau und hat eine Fehlerbreite von $\pm 3\%$.

Diese Genauigkeit gilt nur für Chromatogramme auf ein und denselben Papierbogen, denn durch verschieden starke Entwicklung der Chromatogramme können beispielsweise 2 Gamma einer Aminosäure auf dem einen Chromatogramm einer Fläche von 496 ME entsprechen, auf einem anderen Chromatogramm vielleicht einer solchen von 400 oder 600 ME. Es ist daher nicht möglich, aus den Flächenwerten auf absolute Aminosäuren-Werte zu schließen, es sei denn, man ließe auf jedem Chromatogramm eine bestimmte Menge Vergleichssubstanz mitlaufen und "standardisierte"

die Methode auf diese Weise. Andernfalls kann man nur relative Aussagen machen. Unter dieser Einschränkung sind dann allerdings die Aussagen recht genau. Für die vorliegenden Untersuchungen kommt es in erster Linie auf diese Genauigkeit in der Erfassung des quantitativen Verhältnisses mehrerer Aminosäure -Mengen zueinander an, da Vergleiche zwischen Arterie und Vene gezogen werden sollen.

Ein methodischer Arbeitsgang blieb jedoch bei dieser Fehlerberechnung vorerst unbeachtet, nämlich die Enteiweißung. Der Enteiweißungsfehler wurde ermittelt, indem Plasma dreimal getrennt enteiweißt und anschließend die sich ergebenden Flächenwerte der drei Zentrifugate miteinander verglichen wurden. Dabei ergaben sich folgende Werte:

Abschnitt	A	B	C	D	E	Gesamtwert
1)	258,5	435,9	272,1	140,8	307,1	1514,4
2)	344,4	415,8	230,1	145,8	291,7	1427,8
3)	340,1	409,1	268,6	130,1	295,5	1440,4

Mittelwerte

347,6	420,2	256,9	138,9	297,1	1460,2
-------	-------	-------	-------	-------	--------

Abweichungen von den Mittelwerten

1)	+ 10,9	+ 15,7	+15,2	+ 1,9	+ 10,0	+ 53,6
2)	- 3,2	- 4,4	-26,8	+ 6,9	- 5,4	- 33,0
3)	- 7,5	- 11,1	+11,7	- 8,8	- 4,6	- 20,4

Vergleicht man nun die vorangehenden Werte mit der Standardfehlerberechnung, so findet man, daß alle Abweichungen vom Mittelwert (bis auf drei!) kleiner sind als der im vorangehenden errechnete Wert von 14 ME (siehe oben). Daraus folgt, daß die Enteiweißung nur einen geringen Prozentsatz des Gesamtfehlers ausmachen dürfte.

Um auch Klarheit über den Fehler zu bekommen, der allein durch das Papier verursacht wird, wurde ein leeres Chromatogrammpapier nach Durchlaufen der Versuchsanordnung angemessen. In beistehender Abb. 2 sind die dabei gemessenen Schwankungen um den Mittelwert graphisch dargestellt.

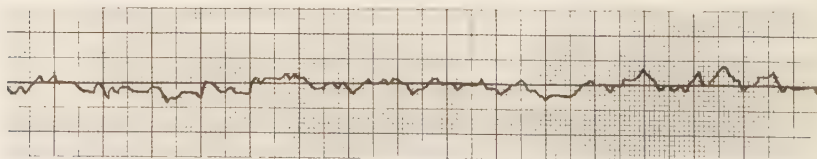


Abb. 2: Schwankungen um den Mittelwert

Bei diesen Abweichungen läßt sich nach der Gauß'schen Formel die mittlere Streuung berechnen:

$$m = \sqrt{\frac{\sum(vv)}{(n-1)}} = 1,5$$

Bei jeder Ablesung ist also stets mit einem mittleren Papierfehler von 1, 5 ME zu rechnen, das sind etwa 10% des Gesamtfehlers.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß bei den Flächenwerten mit einem Fehler von insgesamt 14 ME zu rechnen ist. Um jedoch allen Zufälligkeiten zu begegnen, wurden immer Doppelbestimmungen vorgenommen.

II. Erwägungen und experimentelle Untersuchungen, die für die in Teil I beschriebene Methode die Grundlage bilden.

1. Enteiweißung

Bei der papierchromatographischen Bestimmung der freien Aminosäuren des Blutes müssen zunächst die Eiweißkörper entfernt werden, jedoch dürfen die Aminosäuren dabei nicht mit ausfallen. A. HILLER und D. van SLYKE untersuchten in dieser Hinsicht die gebräuchlichsten Fällungsmittel und gaben ihre Wirkungsweise folgendermaßen an:

In den enteiweißten Filtraten befanden sich Stickstoff pro 100 cm³ in mg:

Fällungsmittel	Gesamter nicht Protein und nicht Harnstoff-Stickstoff	Amino-Säure- Stickstoff	Peptid- Stickstoff
Wolframsäure	28,1	9,2.	4,1
Pikrinsäure	--,-	8,3	4,6
Metaphosphorsäure	28,3	7,9	3,9
Colloidales Eisen	29,4	7,8	-.-
2,5% Trichloressigsäure	28,8	7,9	7,0
5% Trichloressigsäure	26,7	7,5	4,9
10 % Trichloressigsäure	26,1	7,1	4,6
Alkohol (Äthanol)	18,2	4,9	1,4

(Diese Durchschnittswerte wurden mit Ochsenblut erhalten)

Danach scheint Äthanol für die Zwecke der vorliegenden Arbeit am schlechtesten geeignet zu sein, denn man findet in den Alkoholfiltraten nur etwa zwei Drittel des Aminosäurestickstoffes, der in den Filtraten von anderen Enteiweißungsmitteln vorhanden ist.

Man vergleiche hierzu einmal die Aminosäuremenge, die im Blut festgestellt wurden mit der Menge, die sich in etwa 80 %-igem Äthanol löst:

Aminosäuren	Menge im Blut	Löslichkeit in ca. 80%igem Alkohol
	mg %	mg %
Glutaminsäure	3,41	37
Glykokoll	1,77	448
Valin	2,83	250
Leucin	1,91	125

Dabei zeigt sich also, daß die Aminosäuren₁, die im Blut vorhanden sind, durch diese Alkoholkonzentration kaum ausgefällt werden dürften. Wenn man 96%igen Alkohol zusetzt, müßte man durch den Verdünnungseffekt des Serums eine 80%ige alkoholische Lösung der Blutaminosäuren erhalten.

Die im Blut noch vorhandenen Ionen steigern die Löslichkeit der Aminosäuren in so geringer Konzentration noch weiter (Phys. Chem. Flaschenträger 1954, Bd. I. S. 500).

Die geringe Aminosäureausbeute ist also nicht durch eine zu hohe Alkoholkonzentration bedingt, sondern es liegt nach van SLYKE, DD. VIROGRAD-VILCHUR, M, und LOSEE (16) eine Adsorption der Aminosäuren an die koagulierenden Eiweißkörper vor. Es soll sich also bei der Verminderung der Aminosäuren bei der Alkoholenteiweißung um keinen rein chemischen, sondern um einen vorwiegend physikalischen Vorgang handeln.

Ein weiterer Nachteil, den Äthanol zusammen mit anderen Fällungsmitteln haben soll, ist die unvollständige Ausfällung des Eiweißes. Man konnte tatsächlich bei Enteiweißung mit Äthanol bei Zimmertemperatur am Startpunkt der Chromatogramme einen blauen Fleck beobachten, der von freien NH_2 - Gruppen der Proteine oder Polypeptide herrührte, die im Filtrat noch vorhanden sein mußten. Dieser Fleck war auch nach dem Steigen der Chromatogramme noch vorhanden. Ein promptes Verschwinden dieses Fleckes trat ein, wenn bei 0° Celsius enteiweißt wurde. Die Ursache hierfür konnte noch nicht geklärt werden.

Diesen Nachteilen des Äthanols als Enteiweißungsmittel stehen folgende sehr wesentliche Vorteile für die Papierchromatographie gegenüber:

Er läßt sich leicht und vollständig entfernen und hinterläßt also keine störenden Faktoren, wie z. B. alle Schwermetallsalze. Dieser Vorzug des Äthanols ist besonders deutlich sichtbar, wenn man den einen Teil eines Serums mit Äthanol, den anderen mit Trichloressigsäure enteiweißt und dann die Amino-Säuren papierchromatographisch darstellt. Bei Äthanol ergeben sich befriedigend voneinander getrennte Zonen der einzelnen Aminosäuren₁, während bei Trichloressigsäureenteiweißung die R_f - Werte stark verändert und wegen schlechter Trennung nicht exakt bestimmbar sind. Man könnte zwar durch chemische Manipulationen die Trichloressigsäure entfernen, würde aber dadurch bei der geringen Serummenge, die zur Verfügung steht, die Fehlerbreite stark vergrößern. Aus all diesen Gründen wurde bei den Untersuchungen dieser Arbeit die Äthanolenteiweißung benutzt. Die dabei auftretenden Aminosäureverluste wurden in Kauf genommen, da arterio-venöse Differenzen zu bestimmen waren und keine absoluten Mengen im Blut. So konnte man von der Voraussetzung ausgehen, daß der durch den Aminosäureverlust entstehende Fehler im venösen und im arteriellen Blut gleich sein muß.

2. Aufbringen des Blutfiltrates auf das Chromatogrammpapier.

a.) Auftragen

Hat die aufzutragende Substanz gerade die richtige Konzentration in der vorliegenden Lösung, so kann mit einer Pipette (Elphorpipette), oder bei nicht quantitativen Arbeiten mit einer Kapillare ein Tropfen auf dem Startpunkt aufgebracht werden. Ein strichförmiges Auftragen wie bei der Elek-

trophorese wurde der Genauigkeit halber wieder verlassen. Bei Alkoholblutfiltraten genügte ein Tropfen nicht. Das Filtrat mußte entweder vor dem Auftragen konzentriert werden, oder es mußte Auftragen und Konzentrieren miteinander kombiniert werden. Anfangs wurde ein bestimmter Teil des Filtrates im Uhrglas auf dem Wasserbad eingedampft, dann mit 100 mm^3 Aqua dest. aufgenommen und dieses aufgetragen. Bald wurde jedoch diese Methode wegen der dadurch entstehenden Fehler verlassen und Auftragen und Konzentrieren zu einem Arbeitsgang verbunden. Es wurde dazu folgende Anordnung geschaffen:

An einem Stativ wurde ein Fön befestigt und darüber im Abstand von 20 cm eine Sperrholzplatte mit einer runden Öffnung von 3,5 cm Durchmesser. Die Entfernung Fön - Tisch wurde so gewählt, daß in Tischnähe etwa eine Temperatur von 55° Celsius herrschte. Das Chromatogramm wurde auf dem Tisch so befestigt, daß der Punkt, auf dem die Substanz aufgebracht werden sollte, genau in der Mitte der Öffnung lag.

Eine Blutzuckerpipette, die unten plan - geschliffen ist, wird, mit der aufzutragenden Substanz gefüllt, senkrecht auf das Papier aufgesetzt. In der Nähe wird ein Lot angebracht, an dem man den senkrechten Stand der Pipette kontrollieren kann. Die Pipette wird nicht befestigt, sondern nur durch einen Ring in der senkrechten Lage gehalten. Durch das Gewicht der Pipette wird ihre plane Fläche gegen das Papier gedrückt und die Öffnung verschlossen. Die Pipette läuft auf diese Art nicht aus, sondern es kann nur so viel Lösung nachlaufen, wie im Papier versickert und verdunstet. Es bildet sich auf dem Papier ein Fleck, der etwa einen Durchmesser von 6 - 8 mm hat. Für Alkoholblutfiltrate hat sich eine Blutzuckerpipette mit planem Boden als am geeignetsten erwiesen. Hat man jedoch eine Lösung von mehr als 20% Wassergehalt, dann läuft die Pipette aus und der Fleck wird zu groß. Schmilzt man in einem solchen Fall zu und feilt eine kleinere Öffnung hinein als die ursprüngliche, so kann man erreichen, daß der Fleck klein bleibt. Man kann die Fleckengröße auch in gewissen Grenzen durch die Temperatur beeinflussen. In Flecknähe herrscht beim Auftragen mit dem Fön eine Temperatur von 55° Celsius. Entfernt man den Fön etwas, oder schaltet auf kalt, verringert also die Temperatur, so wird der Fleck auch sofort größer. Aber im Laufe der Arbeit wurde auch diese Art aufzutragen zugunsten der Genauigkeit verlassen. Folgende Punkte waren dafür ausschlaggebend: a) Bei warmen Fön veränderte sich aus noch unbekannten Gründen das "Aminosäurespektrum" und bei kaltem wurden die Startpunkte zu groß. Die Ursache der Veränderung der "Aminosäurespektren" konnte nicht ermittelt werden. b) Es kam vor, daß sich das aufgetragene Filtrat nicht gleichmäßig über den Startpunkt verteilte. Die Folge war, daß die sich ergebenden Aminosäureflecke teilweise verzerrt waren (siehe auch: Lösungsmittel und deren Veränderung durch Ionen). All diese Fehler lassen sich vermeiden, wenn man bei kaltem Luftstrom Tropfen aufträgt und genauestens darauf achtet, daß der Startpunkt nie größer und nie kleiner als 10 mm im Durchmesser ist. Man braucht allerdings $15'$, um $0,1\text{ cm}^3$ Blutfiltrat aufzutragen. An Stelle einer Blutzuckerpipette wäre die Agla-Micrometersyringe der Firma Burroughs Wellcome & Co., London zu empfehlen. An der oben beschriebenen Apparatur wurde ferner noch geändert, daß das Papier nicht wie bisher von unten, sondern von oben befönt wurde. Dadurch wird das Chromatogramm gegen den Tisch ge-

drückt und man braucht es nicht mehr eigens zu befestigen.

b.) Aufzutragende Menge

Es wurden verschiedene Mengen Blutfiltrates aufgetragen und gefunden, daß 100 mm^3 am besten war. (Der Aminosäuregehalt von 100 mm^3 Blutfiltrat entspricht dem Aminosäuregehalt von 20 mm^3 Serum.) Trug man weniger Filtrat auf, so waren die Aminosäuren sehr schwach auf dem Chromatogramm zu sehen, trug man mehr auf, so bekam man schlechte Trennung und sogenannte "Schwänze", d.h.: die Aminosäuren zogen beim Wandern einen kometartigen Streifen hinter sich her. KOFRANY (12) konnte feststellen, daß die Aminosäuren beim Wandern auf dem Papier vom Startpunkt ab eine schwache fluoreszierende Bahnspur zurücklassen, die durch ihre Adsorption an die Papierfaser zustande kommt. Die adsorbierte Menge hängt neben vielen anderen Faktoren vor allem sehr stark von der Aminosäuremenge ab und kann selbstverständlich eine starke Fehlerquelle darstellen.

3. Lösungsmittel und deren Veränderung bei Zusatz von Ionen.

Mc. FARREN untersuchte die R_f -Werte von Aminosäuren bei verschiedenen P_H der Lösungsmittel (siehe Abb. 3).

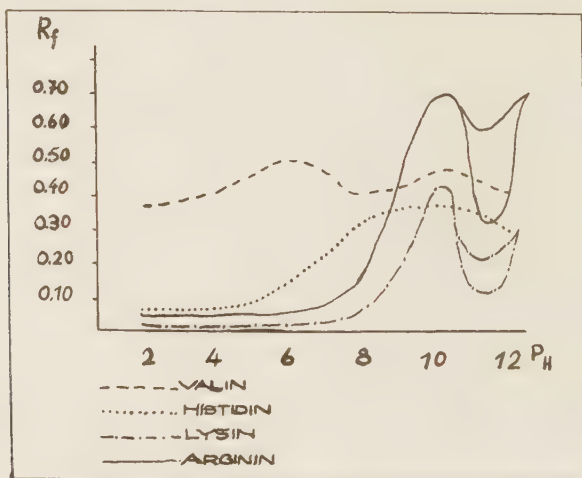


Abb. 3 Die Abhängigkeit der R_f -Werte der Amino-Säuren vom P_H des Lösungsmittels. (Nach Mc. FARREN (4).)

Dabei zeigte sich, daß sich die R_f -Werte der Aminosäuren in Abhängigkeit vom P_H mehr oder weniger ändern. Es ist gleichgültig, ob man dem Lösungsmittel Ionen zusetzt und dadurch sein P_H verändert, oder ob die zu untersuchende Substanz als solche ionenreich ist. Immer resultiert eine

Veränderung der R_f -Werte. Diese Veränderungen wurden untersucht, indem man reine Aminosäuren auftrug und dabei den Einfluß von Kochsalzlösung auf die R_f -Werte der Aminosäuren prüfte. Man fand, daß deutliche R_f -Unterschiede zwischen den Aminosäuren mit und ohne Kochsalz entstanden. Auch zeigte sich, daß die R_f -Werte der Aminosäuren in Blutzentrifugaten andere Waren, als die der reinen Aminosäuren. Diese Veränderungen werden durch die im Blut vorhandene Kochsalzmenge sowie andere Elektrolyte und sonstige Faktoren erklärt. Besonders erheblich waren, wie bereits bei der "Enteweißung" beschrieben, die Veränderung bei Trichloressigsäureenteißung. Die Trichloressigsäure verändert sehr stark die Ionenkonzentration und führt infolgedessen zu Veränderungen der R_f -Werte. Wenn man auch kein ionenreiches Fällungsmittel wie Trichloressigsäure verwendet, so sind doch meist schon in den biologischen Filtraten Ionen vorhanden, die störend wirken können. Man kann nun die Ionen durch Elektrodialyse (GORDON (8), Elektrophorese oder auch mit geeigneten Ionenaustauschern (TURBA (17)) entfernen. Aminosäuren werden aber dadurch meist auch entfernt; damit entfiel dieses Vorgehen für die vorliegenden Untersuchungen. In gewissen Grenzen kann man auch gepufferte Lösungsmittel verwenden, um Salzeffekte (respektiv Ionenwirkung) auszuschalten. Das Butanol-Eisessig-Wasser-Lösungsmittel verhält sich wie ein gepuffertes Lösungsmittel (Mc FARREN (4)). Im Vergleich mit anderen Lösungsmitteln stellte sich heraus, daß die Aminosäuren hiermit eindimensional relativ gut getrennt werden. Aber auch bei diesem Lösungsmittel konnte man bei bestimmten Aminosäuren kleine Verschiebungen ihrer R_f -Werte beobachten, die parallel mit der Größe des Startpunktes gingen. Hatte ein Startpunkt einen etwas größeren Durchmesser als der andere, so bekam man ein "Aminosäurespektrum" mit durchschnittlich zwar minimal, aber doch registrierbar veränderten R_f -Werten. Diesen Effekt erklären wir uns dadurch, daß beim kleineren Fleck eine größere Ionenkonzentration pro mm^3 herrschte als beim größeren Fleck (beide Male wurde die gleiche Menge aufgetragen, nur auf verschieden große Flächen). Aus der Ionenkonzentration pro mm^3 entspringt aber die Veränderung der R_f -Werte. Erzeugt man durch einseitiges Auftragen innerhalb eines Startpunktes von 10 mm Durchmesser zwei verschiedene Ionenkonzentrationen, so kann man sogar hierdurch Verzerrungen des Aminosäurefleckes bekommen. Sehr eindrucksvoll kann man sich den Einfluß von Ionen auf die Aminosäuren vor Augen führen, wenn man auf ein Chromatogramm verschiedene Mengen von ein und demselben Zentrifugat aufträgt. Man beobachtet bei zunehmender Zentrifugatmenge eine deutlich zunehmende Verminderung aller R_f -Werte.

4. Entwickeln

Die Aminosäuren müssen, da sie an sich farblos sind, sichtbar gemacht werden. Entsprechend den vielen chemischen Farbreaktionen, die bestimmte Aminosäuren mit gewissen Reagentien geben können, wurden sehr viele Verfahren ausgearbeitet, um die Aminosäuren auf dem Chromatographiepapier zu färben (CRAMER, PC, 1954 (2)). (Chromatographie MERCK (13)) Am empfindlichsten und ziemlich allumfassend ist die Färbung mit Ninhydrin. Mit Ninhydrin färben sich alle freien NH_2 -Gruppen. Prolin und

Oxyprolin geben allerdings mit Ninhydrin nur schwach gelbe Flecke, auch die Flecke mit Tryptophan - Derivaten sind nur schwach.

Die Chromatogramme kann man besprühen oder in die Entwicklungsflüssigkeit tauchen. Beim Tauchen besteht die Gefahr, daß die zu entwickelnden Substanzen vom Entwickler leichter gewaschen werden. Beim Besprühen wird die Entwicklung leicht etwas ungleichmäßig. Für diese Arbeit wurde die Tauchmethode gewählt, weil es auf Differenzen zwischen zwei "Aminosäurespektren" auf ein und demselben Blatt ankam. Beim Tauchen geht, wenn schon kleinste Mengen herausgewaschen werden, bei allen Aminosäuren gleich viel verloren. Da aber die bei dieser Arbeit benutzte Tauchlösung sehr viel Aceton enthält, dürfte der Verlust an Aminosäuren, die in Aceton unlöslich sind, praktisch gleich Null sein. Nach dem "Tauchen" werden die Chromatogramme entweder kurze Zeit auf 105° Celsius erwärmt, oder man läßt sie 24 Stunden bei Raumtemperatur hängen, was schonender ist (CRAMER, PC, (2)). In vorliegender Arbeit wurde beides kombiniert, die Chromatogramme wurden nur auf 85° Celsius erwärmt, blieben 24 Stunden liegen und wurden dann ausgemessen. Länger soll man mit dem Auswerten der Flecke nicht warten, da sie schon nach 36 Stunden die scharfen Konturen verlieren.

5. Quantitative Auswertung der Chromatogramme

Die quantitative Auswertung ist nicht auf die Erfassung der absoluten Aminosäuremengen ausgerichtet, sondern auf das Herausfinden und Festhalten eventuell vorhandener Differenzen in mehreren Chromatogrammen, speziell von venösem und arteriellem Blut. Anfangs wurden die Substanzen strichförmig aufgetragen. Es war beabsichtigt, die Chromatogramme wie die Elektrophoresestreifen nach Grassmann auszuwerten. Die Ergebnisse waren jedoch sehr unbefriedigend. Sehr bald wurde daher punktförmig aufgetragen und zum Ausphotometrieren ein Vorschaltgerät für das Lange - Kolorimeter konstruiert. Dabei ergaben sich ganz brauchbare Kurven. Noch bessere Kurven bekam man allerdings mit dem "Eppendorphotometer" bei der Verwendung einer Nephelometrielinse.

Durch die Berechnung der Fläche der Kurven erhält man einen Eindruck von der Substanzmenge, denn eine Fläche setzt sich aus vielen Einzelextinktionen zusammen (Flächenintegral). Eine Extinktion ist aber proportional der Farbtintensität und die Farbtintensität ist wiederum proportional der Aminosäuremenge (Lambert- Beer'sches Gesetz).

Dabei ist zu bedenken, daß die einzelnen Aminosäuren mit Ninhydrin verschiedene Farbtöne geben und infolgedessen auch verschiedene Extinktionen. Sind z. B. zwei Aminosäuren ungenügend getrennt, so wird auch die Extinktion in diesem Bereich von zwei Faktoren bestimmt und sie läßt infolgedessen keinen Schluß auf den absoluten Aminosäuregehalt zu. Ergeben sich aber in einem Bereich Flächenunterschiede, so muß die Aminosäurezusammensetzung oder die Aminosäuremenge anders sein. Weil die absolute Aminosäureangabe wegen ungenügender Trennung nicht möglich ist, beschränkt man sich bei dieser Arbeit auf Flächenunterschiede, wobei die Meßeinheit (= ME) einer Extinktion von 0,01 am "Eppendorphotometer" entspricht. Bei der Glutaminsäure, die ziemlich gut getrennt ist, entspricht

1 ME einer Menge von 0,004 Gamma, oder noch anders ausgedrückt: 1 ME entspricht 0,02 mg%, bezogen auf Serum.

6. Stehlaßeffect

D. A. Mc. FADYEN (5) stellte fest, daß Serum immer mehr meßbare freie Aminosäuren enthält als Plasma. Der Aminosäuregehalt sei auf 110 - 140 % zu dem im Serum angestiegen. Dabei sei es gleichgültig, ob sich das Serum bei Gegenwart oder bei Abwesenheit der Erythrozyten bildet.

Im Rahmen der Arbeit wurde die Vermehrung der Amino-Säuren mit der papierchromatographischen Methode in Abhängigkeit von der Zeit untersucht. Es wurde Nativblut abgenommen und in acht Proben aufgeteilt. Davon wurde im Abstand von ca. 2 Stunden jeweils eine Probe aufgearbeitet, zwischen den letzten beiden Proben war ein Abstand von jeweils 12 Stunden.

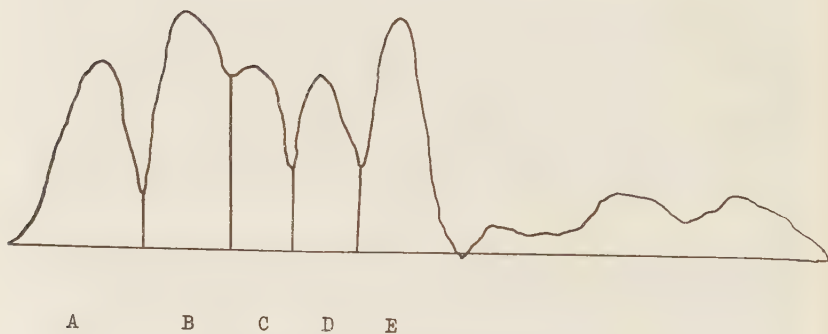
Es konnte eine deutliche Vermehrung gewisser Aminosäuren, besonders von Glutaminsäure und Alanin-Threonin, festgestellt werden; und zwar fanden sich die stärksten Vermehrungen nicht nur, wie Mc. FADYEN meinte, während der ersten 20 Minuten, also im Zusammenhang mit der Gerinnung, sondern es vermehrten sich die Aminosäuren auch in der darauffolgenden Zeit.

ERGEBNISSE

Abb. 4 stellt eine Standardkurve dar, wie sie mit der angewandten Methode gewonnen wird. Die Kurve wird in fünf Abschnitte A, B, C, D und E eingeteilt. Darunter sind die Aminosäuren angegeben, die den einzelnen Abschnitten einzuordnen sind. Bei jeder Aminosäure ist außerdem der R_f -Wert angegeben, sowie die Menge, die im Blute vorzukommen pflegt. (R_f -Werte nach CRAMER; Aminosäure-Menge nach den GEIGY-Tabellen.)

STANDARDKURVE

Abb. 4



mg/100 cm ³ im Plasma (im Serum)	R _f -Werte Bu:E: W=4:1:1	Aminosäuren
1,4	0,08	Cystin
2,95	0,14	Lysin
1,42	0,20	Histidin
2,24	(0,20)	Arginin
---	0,24	Asparaginsäure
0,5	0,25	Citrullin
1,77	0,26	Glycin
3,41	0,30	Glutaminsäure
2,02	0,35	Threonin
3,97	0,38	Alanin
---	0,43	Prolin
1,48	0,45	Tyrosin
1,08	0,50	Tryptophan
0,38	0,55	Methionin
2,83	0,60	Valin
1,38	0,68	Phenylalanin
1,91	0,73	Leucin

Nr.	Blut	A	B	C	D	E	Gesamtwert
1	A	483 (-106)	498 (-50)	341 (+9)	210 (-23)	566 (-87)	2098 (257)
	V	589	548	332	233	653	2355
2a	A	161 (-48)	527 (-89)		189 (-47)	585 (-116)	1462 (300)
	V	209	616		236	701	1762
2b	A	195 (-63)	631 (-88)		222 (+36)	549 (-105)	1599 (218)
	V	258	719		186	654	1817
3a	A	402 (+40)	891 (+54)		269 (-40)	430 (-59)	1992 (-5)
	V	362	837		309	489	1997
3b	A	380 (-40)	830 (-20)		233 (-55)	471 (-88)	1914 (-203)
	V	420	850		288	559	2117
4a	A	284 (+14)	242 (-55)	224 (32)	137 (14)	265 (+4)	1152 (+7)
	V	270	297	192	123	261	1145
4b	A	311 (+35)	256 (-20)	223 (-29)	141 (+ 5)	266 (51)	1199 (-60)
	V	276	266	252	136	317	1259
5a	A	333 (-36)	256 (26)	176 (-15)	200 (-5)	359 (-43)	1324 (-127)
	V	369	282	191	205	402	1451
5b	A	379 (+4)	292 (-24)	225 (+3)	225 (+4)	413 (-22)	1536 (-35)
	V	375	316	222	221	435	1571
6a	A	296 (+52)	374 (+65)	227 (+17)	225 (+26)	404 (+30)	1527 (191)
	V	244	309	210	199	374	1336
6b	A	311 (+120)	330 (+26)	212 (+13)	202 (-7)	398 (+3)	1456 (+157)
	V	191	304	199	209	395	1299
7a	A	375 (+31)	402 (-84)	195 (-5)	168 (-14)	477 (-17)	1619 (-89)
	V	344	486	200	182	494	1708
7b	A	388 (-3)	396 (-49)	209 (+14)	175 (+1)	498 (32)	1667 (-4)
	V	391	445	195	174	466	1671
8a	A	443 (+25)	449 (-24)	178 (+30)	161 (+21)	280 (+1)	1514 (+55)
	V	418	473	148	140	279	1459
8b	A	460 (+30)	536 (+71)	162 (+9)	143 (-5)	226 (-91)	1528 (+15)
	V	430	465	153	148	317	1513

Nr.	Blut	A	B	C	D	E	Gesamtwert
9a	A	357 (+6)	420 (+20)	297 (-38)	175 (+1)	441 (---)	1690 (-11)
	V	351	400	335	174	441	1701
10a	A	415 (-59)	284 (-54)	245 (+25)	151 (-25)	295 (-28)	1389 (-142)
	V	474	338	220	176	323	1530
10b	A	414 (+3)	259 (-95)	172 (-38)	170 (+2)	310 (---)	1324 (-129)
	V	411	354	210	168	310	1453
11a	A	461 (+27)	387 (-9)	312 (-51)	209 (-14)	387 (-28)	1757 (-75)
	V	434	396	363	224	415	1832
11b	A	408 (-35)	370 (-13)	349 (-27)	188 (-68)	332 (-114)	1647 (-257)
	V	443	383	376	256	446	1904
12a	A	376 (-124)	305 (-83)	305 (-59)	141 (-22)	325 (+68)	1453 (-220)
	V	500	389	364	163	257	1673
12b	A	512 (-38)	423 (+15)	417 (+40)	214 (+30)	315 (-16)	1881 (+31)
	V	550	408	377	184	331	1850

A, B, C, D und E = Abschnitte des Aminosäurespektrums
(siehe Abb. 4)

A (wagerecht) = arterielles Blut

V (wagerecht) = venöses Blut

a und b bei den Zahlen weisen darauf hin, daß zwei Bestimmungen mit ein und demselben Blut durchgeführt wurden.

Die Zahlen in Klammern sind die Unterschiede zwischen Arterie und Vene. Das Plus-Zeichen bedeutet, daß die Arterie, das Minus-Zeichen, daß die Vene überwiegt. Die Benennung der Zahlenwerte ist ME = 0,01 Extinktion.

N.B. Werte, die miteinander verglichen wurden, wurden mit derselben Pipette aufgetragen.

Kreislaufanalyse

=====

(Folgende Werte wurden freundlicherweise von Herrn
Dr. G o t t s t e i n zur Verfügung gestellt.)

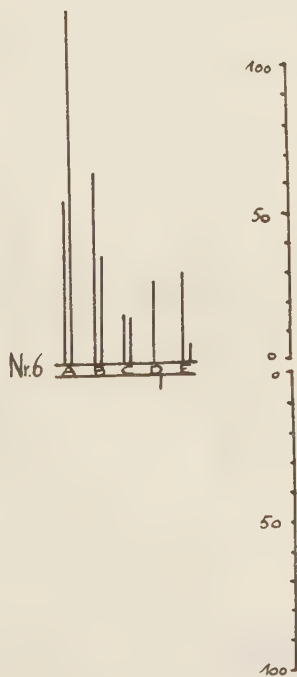
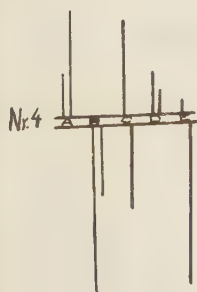
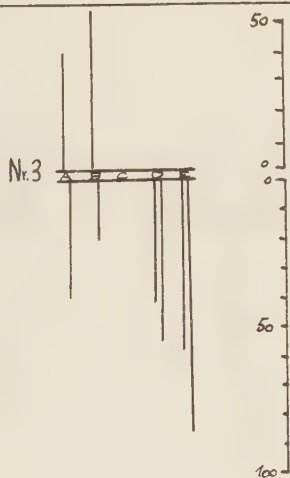
Nr.	Durchblutung cm ³ /100g/Min	O ₂ - Aufnahme cm ³ /100g/Min	a-v-O ₂ Differenz Vol. %	a-v-CO ₂ Differenz Vol. %	O ₂ art Vol. %	CO ₂ art Vol. %
1	43,1	2,15	5,0	3,9	15,3	38,4
2	33,2	1,29	3,9	4,2	13,4	39,9
3	52,8	2,31	4,0	5,4	15,4	44,1
4	37,6	1,47	3,9	8,4	14,2	39,2
5	42,1	2,96	6,3	5,9	16,9	34,6
6	59,0	4,48	7,6	7,6	15,4	42,4
7	19,8	1,37	6,9	5,3	16,9	36,3
8	35,5	2,24	6,3	6,8	16,3	45,0
9	67,5	3,85	5,7	5,7	15,5	44,6
10	53,4	3,50	5,8	4,7	16,9	47,1
11	53,4	3,83	5,8	4,7	16,9	47,1
12	75,0	3,83	5,0	5,1	15,5	40,9
Normal	56,0	3,7	6,0	6,0	20,0	45,0

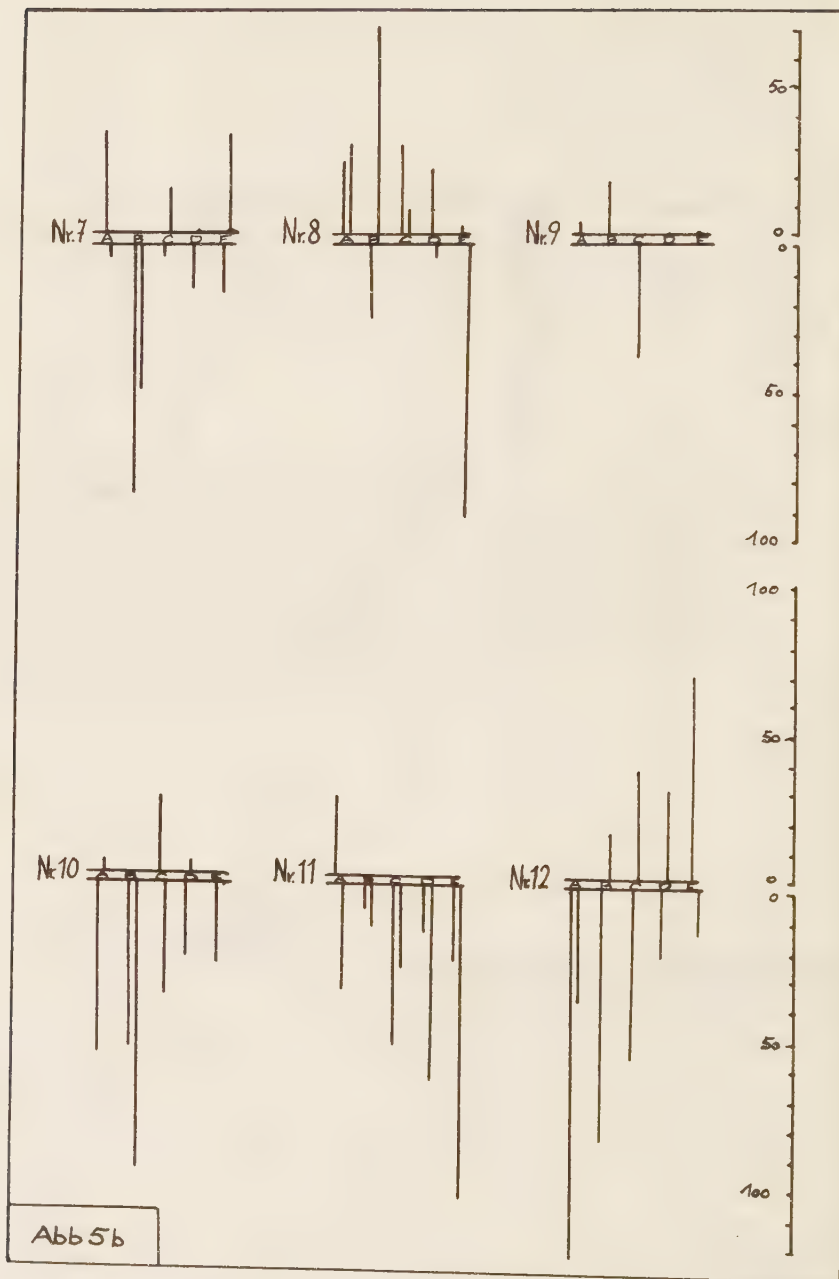
=====

Nr.	Blutzucker Art.	Vene	RR	Eryth. Mill.	Hb.	Diagnose und Bemerkungen
1	131	131	145/110	4,04	85	Cerebralsklerose decom. Hypot.
2	131	123	140/ 70	3,55	75	Cerebralsklerose
3	101	91	135/ 70 (beh)	3,74	81	Myocardschaden decomp. Hypot.
4	64	63	110/ 70	3,09	85	Cerebralsklerose Apoplex vor 3 Jahren
5	150	140	190/115 (beh) 130/ 80	4,5	85	Mitralinsuff., Hypert.
6	153	140	220/110	4,24	83	Hydrocephalus internus innerhalb 4 Wochen ent- standen unklare Genese (Röntgenolog. gesichert) Hirnatrophischer Prozeß
7	118	116	150/ 90	4,5	85	Recklinghausensche Er- krankung (Neurofibromatosis)

8	100	92	160/100	4,5	90	Cerebrale Durchblutungsstörungen, vor einem halben Jahr ohnmächtig vom Rad gestürzt. Schmerzen im rechten Arm.
9	105	95		4,5	90	Multiple Sklerose temp. Abblassung
10	97	89	170/100	5,02	96	Essent. Hypert.
11	97	89	130/90	4,99	94	Schilddrüsenunterfunktion
12	75	67	165/95	4,5	90	Amyotrophe Lateralsklerose

Abb. 5a und 5b. Von den zwölf Fällen wurden die "Aminosäurespektren" nach Tabelle graphisch dargestellt. Die Null-Linie (= Abszisse) ist immer mit der Vene identisch. Der Vektor nach oben besagt, um wie viele ME- Aminosäuren die Arterie mehr enthält als die Vene; der nach unten, um wie viele ME- Aminosäuren die Arterie weniger hat als die Vene. Jeder Vektor ist in der Null - Linie mit einem Buchstaben versehen, der den Abschnitt des "Aminosäurespektrums" angibt. Von ein und demselben Blut wurden jeweils Doppelbestimmungen gemacht. Der zweite Vektor bei einem Buchstaben bedeutet den Doppelwert.





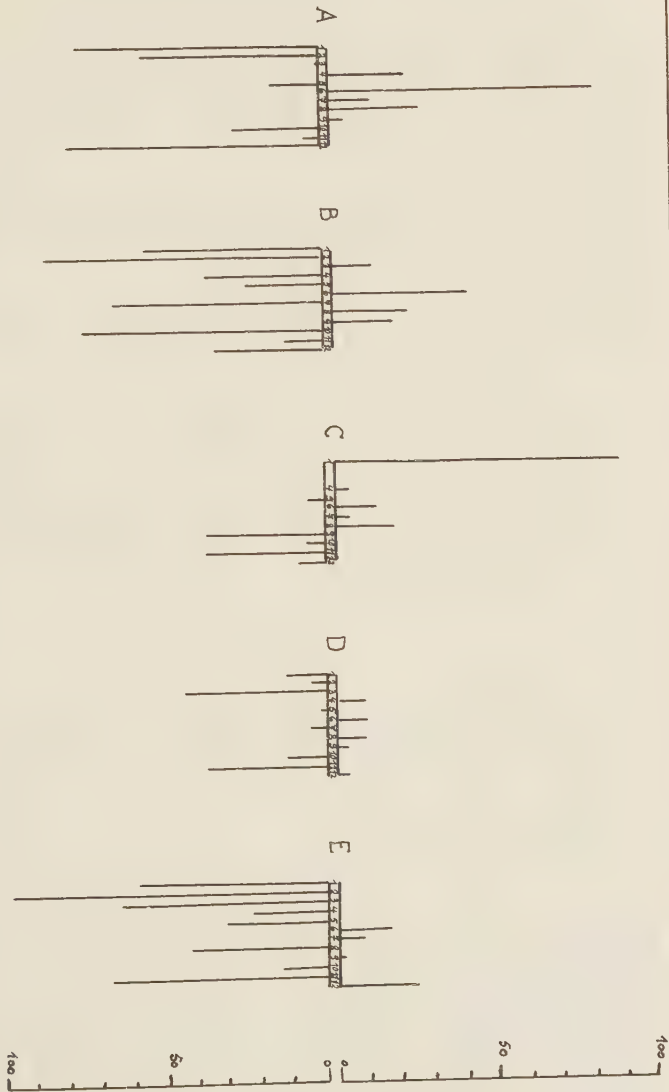


Abb. 6

Abb. 6. Es handelt sich hier um dieselben Fälle, wie in Abb. 5. Es wurden lediglich die Vektoren nach den Abschnitten A, B, C, D und E geordnet und die Doppelbestimmungen zu einem Vektor zusammengefaßt.

DISKUSSION

Es muß der Diskussion der Ergebnisse vorangestellt werden, daß es die ersten Ergebnisse einer im Teil I dieser Arbeit entwickelten Methode sind. Außerdem muß darauf hingewiesen werden, daß diese Werte von kranken Personen stammen, und daß man daraus, weil Vergleichsmaterial vom Gesunden fehlt, aus dem Einfluß bestimmter Krankheiten auf den Hirnstoffwechsel der Aminosäuren nur sehr bedingte Schlüsse ziehen darf. Wir sind uns auch bewußt, daß die Anzahl der angeführten Fälle nicht ausreichend ist, um endgültige, bindende Schlußfolgerungen ziehen zu können. Ob es sich jedoch lohnt, das Problem des Aminosäurestoffwechsels mit dieser papierchromatographischen Methode weiterhin anzugehen, das soll am Ende der Diskussion beantwortet werden.

Unter Beachtung all dieser Einschränkungen soll versucht werden, die Ergebnisse nach bestimmten Gesichtspunkten zu ordnen. Sowohl an Hand des Zahlenmaterials als auch der graphischen Darstellungen fällt das Folgende auf.

- 1.) Die Aminosäuren überwiegen im allgemeinen in der Vene.
- 2.) Aus diesem Gesamtbild fallen die Fälle Nr. 6 und 8 durch eindeutiges Überwiegen des Aminosäuregehaltes in der Arterie heraus.
- 3.) Die Aminosäuren in Abschnitt B und E überwiegen eindeutig in der Vene. Auffälligerweise ergeben sich kaum Differenzen bei C und D. Der Abschnitt D entspricht der Glutaminsäure und ist gut von den Amino-Säuren abgetrennt.

Wie lassen sich nun diese Beobachtungen erklären?

- a) Wird der Aminosäurebedarf des Gehirns lediglich aus freien Aminosäuren gedeckt?
- b) Ist das Gehirn in der Lage, auch gebundene Aminosäuren freizusetzen oder aus anderen Stoffen zu bilden?
- c) Werden bestimmte Aminosäuren selektiv vom Gehirn aufgenommen?
- d) Lassen sich Zusammenhänge mit Diagnosen und anderen Untersuchungen erkennen?

Zu a). Wenn dem Gehirn tatsächlich zu seinem Baustoff-oder Energiestoffwechsel nur die freien Aminosäuren des Blutes zur Verfügung stünden, dann wäre ein Überwiegen des Aminosäuregehaltes in der Arterie zu fordern. In Wirklichkeit findet man dies nur bei Fall Nr. 6 und 8 deutlich. Bei beiden Patienten sind aber schwerste neurologisch (bei Nr. 6 auch röntgenologisch) faßbare Veränderungen am Hirn vorhanden. Da sich diese beiden Fälle anders verhalten als alle anderen untersuchten, wäre hier an einen pathologisch hohen Aminosäurebedarf des Hirns bzw. nach unserer Ansicht um eine ungenügende Proteasentätigkeit zu denken.

Zu b). Für den normal funktionierenden Stoffwechsel wurde von uns ein Überwiegen der Aminosäuren in der Vene gefunden. Dies kann so erklärt werden, daß im Hirn die Aminosäuren im Überschuß entstehen, so daß

sie in der Vene nachweisbar sind. Nach KIES und SCHWIMMER (11) enthält das Gehirn proteolytische Fermente. Möglicherweise sind diese für den Überschuß der Aminosäuren, die aus gespaltenem Eiweiß stammen können, in der Vene verantwortlich zu machen. Andererseits kommt nach RAFAELSON, WINZLER und PEARSON (14) nach Gabe von Glukose mit markiertem Kohlenstoff bei Mäusen der radioaktive Kohlenstoff in die Aminosäuren des Hirns. Danach müßte also Glukose zur Bildung von Aminosäuren im Hirn herangezogen werden. Auch mit einer solchen intracerebralen Aminosäuresynthese ließe sich die "Aminosäureausscheidung" des Hirns erklären.

Zu c). Das Hirn scheint bestimmte Aminosäuren selektiv aufzunehmen. Nach SCHURR (15) wird Glutaminsäure im Hirn stärker angereichert als z. B. Threonin. Leucin, Isoleucin, Valin, Lysin sowie Arginin sind im Hirn in niedrigerer Konzentration vorhanden als im Plasma. Der Abschnitt E unserer Chromatogramme, der zum Teil von Threonin gebildet wird, ist fast stets in der Vene vermehrt. Das besagt, daß, wenn im Hirn etwa Proteine gespalten werden, z. B. Threonin gleichsam als Abfall in der Vene vermehrt erscheinen muß, während andere Aminosäuren aufgenommen werden, was auch tatsächlich beobachtet werden kann. Ähnlich verhält es sich mit Abschnitt B, der vor allem vom Arginin gebildet wird. Eigenartigerweise kann bei D, dem Glutaminsäureabschnitt, keine eindeutige Differenz zwischen Arterie und Vene gefunden werden. Das würde also bedeuten, daß das Hirn der freien Glutaminsäure des Blutes nicht bedarf, obwohl Glutaminsäure im Hirn schon rein mengenmäßig eine zentrale Rolle spielt.

Zu d). Vergleicht man die graphische Darstellung der Ergebnisse (Abb. 5) dieser Arbeit und die entsprechenden Diagnosen und Befunde, so scheint nach einem apoplektischen Insult die "Freisetzung" von Aminosäuren gestört zu sein, so daß das Hirn auf die freien Aminosäuren des Blutes zurückgreifen muß. Es sind infolgedessen etliche Aminosäuregruppen in der Vene vermindert. Bei Nr. 6, wo alle Aminosäuren eindeutig in der Arterie überwiegen, findet man bei der Kreislaufanalyse außer einer vergrößerten Glukosedifferenz und einer vermehrten Sauerstoffaufnahme die übrigen Werte normal. Bei Nr. 7 ist der Durchblutungswert enorm erniedrigt, das Aminosäurespektrum zeigt jedoch keine besonderen Merkmale. Es besteht hier weder eine vermehrte Aminosäureausschöpfung infolge des geringen Blutangebotes, noch ein stärkeres Überwiegen der venösen Aminosäurewerte über die arteriellen, was unter der Voraussetzung einer Aminosäureabgabe durch das Hirn bei verminderter Zirkulation zu erwarten wäre.

Soweit die Ergebnisse zu einem solchen Schluß ausreichen, möchte man annehmen, daß das gesunde Hirn fähig ist, Aminosäuren freizusetzen und selektiv aufzunehmen. Bestimmte Veränderungen im Hirn scheinen die Aminosäuredifferenz zu beeinflussen. Die Aminosäuredifferenz scheint in keinem signifikanten Zusammenhang mit der Hirndurchblutung zu stehen.

Trotz der geringen Anzahl der Fälle ist ersichtlich, daß es möglich ist, mit Hilfe der Papierchromatographie das Problem des cerebralen Aminosäurestoffwechsels zu bearbeiten. Das aufzuzeigen, war eine Hauptaufgabe dieser Arbeit.

ZUSAMMENFASSUNG

In vorliegender Arbeit wurde der Versuch gemacht, im Rahmen der in der hiesigen Klinik üblichen Kreislaufanalyse die arterio-venösen Differenzen freier Aminosäuren zu beurteilen. Für diesen Zweck wurde ein besonderer Analysengang entwickelt. Bei den Untersuchungen wurden, abgesehen von der Glutaminsäure, keine einzelnen Aminosäuren bestimmt, sondern die Aminosäuren wurden, entsprechend der papierchromatographischen Trennung, gruppenweise photometrisch erfaßt. Im Laufe der Arbeit stellte sich heraus, daß der Aminosäuregehalt im Blut und auch im eiweißlosen Zentrifugat sich in vitro im Laufe der Analyse sehr leicht ändert. Diese Änderung konnte weitgehend verhindert werden durch Zusatz von Heparin und durch Abkühlen auf 0°Celsius. An zwölf Patienten wurden folgende Beobachtungen gemacht.

1) Bei den cerebral Gesunden überwogen die Aminosäuregruppen in der Vene.

2) Die Aminosäuren in Abschnitt B, bestehend hauptsächlich aus Arginin, sowie die Aminosäuren in Abschnitt E, bestehend aus Threonin und Alanin waren bevorzugt in der Vene vermehrt. Bemerkenswerterweise zeigte die Glutaminsäure, die sich gut von den anderen Aminosäuren trennen ließ, keine signifikanten Unterschiede zwischen Arterie und Vene.

3.) Bei einem sich innerhalb vier Wochen entwickelnden Hydrocephalus internus unklarer Genese überwogen eindeutig alle Aminosäuregruppen in der Arterie. Auch bei einem Patienten der einen Apoplex in der Vorschichte hatte, überwogen die Aminosäuregruppen in der Arterie.

Als Ursache "physiologischen" Überwiegens der Aminosäuren in der Vene ist an eine Aufspaltung von Proteinen (11) oder an eine Neubildung von Aminosäuren (14) im Gehirn zu denken. Wegen dieser Fähigkeit des Gehirns kann aus den arterio-venösen Differenzen, unter gleichzeitiger Messung der cerebralen Zirkulation, leider nichts exakt Quantitatives über die Ausschöpfung der freien Aminosäuren des Blutes ausgesagt werden.

Herrn Oberarzt Privat-Dozent Dr. BERNSMEIER möchte ich für die Überlassung des Themas und die Übernahme des Referates herzlich danken.

Herrn Dr. GOTTSTEIN, der die Kreislaufanalyse durchführte, sei für die sorgfältige Blutabnahme und sein großes Entgegenkommen aufrichtig gedankt.

Ein ganz besonderes Anliegen ist es mir, Herrn Dr. BAUMGARTEN für die stete Hilfsbereitschaft und die Anregungen, sowohl während der Untersuchungen, als auch bei der Ausarbeitung der Ergebnisse Dank zu sagen.

Literaturverzeichnis

- 1.) Awapara, Landna, Fuerst u. Seale, J. biol. Chem. 187, 35 (1950)
- 2.) Cramer Friedrich, Papierchromatographie 1954, Verlag Chemie, Weinheim (Bergstraße)
- 3.) Ferraro u. Roizoin, J. Neuropath. exp. Neurol, 6, 383 (1947)
- 4.) M. Farren, E. F. Anal. Chem. 23, 168 (1951)
- 5.) Fadyen D. A., J. biol. Chem., 145, 387 (1942)
- 6.) Flaschenträger Lehnartz, Phys. Chem., Springer-Verlag Berlin (1954)
- 7.) Geigy Documenta Basel, Wissenschaftliche Tabellen (1955)
- 8.) Gordon, A. H., Angew. Chemie, 61, 367 (1949)
- 9.) A. Hiller and D. van Slyke, J. biol. Chem., 53, 253 (1922)
- 10.) Hinsberg-Lang, Med. Chemie, Urban & Schwarzenberg, München 1951
- 11.) Kies u. Schwimmer, J. biol. Chem., 145, 685 (1942)
- 12.) Kofrányi Ernst, Hoppe Seyler Th. 299, 129 (1955)
- 13.) E. Merck A. G., Darmstadt, Chromatographie
- 14.) Rafelson, Winzler und Pearson, J. biol. Chem., 181, 595 (1949)
- 15.) Schurr, J. biol. Chem., 182, 29 (1950)
- 16.) Van Slyke, Virograd, Villchur M., and Losee, J. biol. Chem. 23, 381 (1915)
- 17.) Turba Fritz, Chromatographischer Methoden in der Protein-Chemie, Springer-Verlag Berlin (1954)

Lebenslauf

Als Sohn des Fuhrunternehmers Johann Meyer und seiner Ehefrau Karoline Meyer, geb. Oberhauser, wurde ich, Johann Friedrich Meyer, am 27. Dezember 1930 in Oettingen/ Bayern geboren.

Mit sechs Jahren kam ich in die Volksschule. Von 1942 bis 1949 besuchte ich die sechsklassige Oberschule in Oettingen. Die Ausbildung wurde dort bei Kriegsende wegen Schluß für ein Jahr unterbrochen. Von 1949 bis 1951 ging ich in die Oberrealschule in Nördlingen und erlangte am 17. 5. 1951 die Höhere Reife.

Im Wintersemester 1951/52 schrieb ich mich bei der Naturwissenschaftlichen Fakultät in München ein. Jedoch schon nach dem ersten Semester wechselte ich das Studium und studierte hinfort Medizin.

Am 6. Februar 1954 habe ich die ärztliche Vorprüfung bestanden, am 6. Juni 1957 das ärztliche Staatsexamen.

